

Caracterización del gen de la citotoxina vacuolizante de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas de pacientes residentes en Tolima, Colombia

A.M. López¹, M.P. Delgado¹, C. Jaramillo¹, A. Amézquita¹, G. Parra², M.M. Echeverry²

¹ Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

² Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia

Helicobacter pylori es una bacteria que se encuentra altamente adaptada para colonizar la mucosa gástrica de los humanos. Este microorganismo posee la habilidad de producir una citotoxina vacuolizante conocida como VacA, la cual está codificada por el gen *vacA* y se considera un factor de virulencia importante. Las cepas de *H. pylori* con diferentes formas de *vacA* exhiben una gran variedad de fenotipos algunos de los cuales han sido asociados con enfermedades gastroduodenales. El objetivo del presente estudio fue buscar si hay o no asociación entre la presencia de *H. pylori*, el genotipo de *vacA* y el desarrollo de diferentes patologías gastroduodenales en pacientes residentes en Tolima, Colombia. Para esto se incluyeron 73 pacientes que padecían de gastritis no atrófica, gastritis atrófica, metaplasia y cáncer gástrico. Se realizó una extracción de ADN total de biopsia y a partir de éste se determinó la presencia de la bacteria por medio del gen 16S rADN, especie específico. La prevalencia de *H. pylori* fue de 58.9%. Posteriormente se procedió a realizar la tipificación del gen *vacA*. De las 50 muestras genotipificadas 52% eran *vacA* s1m1, 42% *vacA* s2m2, 4% s1m2 y 2% s1, s2, m1, m2. No se encontró una asociación entre el genotipo de *vacA* y la presencia de las patologías incluidas.

Introducción

La infección con *Helicobacter pylori* ocurre a nivel mundial, pero su prevalencia varía en gran medida entre países y entre poblaciones de un mismo país (25, 33). La prevalencia en los adultos de edad media es del 80% en países en vía de desarrollo y en los países desarrollados es del 20 al 50% (25, 33).

La mayoría de las personas, una vez infectadas con *H. pylori*, pueden permanecer sin desarrollar ningún tipo de sintomatología. No obstante, el curso típico de la enfermedad en pacientes infectados comienza con una gastritis crónica superficial que eventualmente progresa a gastritis atrófica. Este progreso parece ser un evento clave en la cascada

celular que resulta finalmente en el desarrollo de carcinoma gástrico (21,26).

H. pylori posee la habilidad de producir la citotoxina vacuolizante (VacA) que es un factor de virulencia responsable de la formación de vacuolas en células epiteliales gástricas (2,6,12,15,16). Esta citotoxina codificada por el gen *vacA* tiene aproximadamente 3864 pb (6).

VacA produce diferentes efectos que pueden contribuir a la persistencia de *H. pylori* en el nicho gástrico. Esta citotoxina forma poros en las membranas de las células epiteliales, permitiendo la salida de aniones y urea; esto es importante pues la hidrólisis de la urea, catalizada por la ureasa de *H. pylori* protege a la bacteria de la acidez

gástrica. Esta proteína también induce que las uniones epiteliales se suelten permitiendo que los nutrientes puedan potencialmente atravesar la barrera mucosa en beneficio de la bacteria (6, 10, 24,33). Asimismo, se ha sugerido que ésta puede tener un efecto en la supresión inmune específica, colaborando de esta manera en la persistencia del microorganismo: VacA bloquea la maduración de los fagosomas en los macrófagos, inhibe selectivamente la presentación de antígenos a células T y bloquea la proliferación de células T (6,7,10,19,20,33,31,34), entre otros efectos. Igualmente, se ha visto que induce cambios del citoesqueleto, apoptosis (6,10,13,20,33), supresión de la proliferación y migración de las células epiteliales (6,10,20,33).

Las cepas de *H. pylori* con diferentes variantes de *vacA* exhiben una gran variedad de fenotipos y tienen una asociación particular con enfermedades gastroduodenales. Este gen tiene dos regiones diferenciadas, una de 0.5 kb que corresponde a una región de una secuencia señal, denominado *vacA s* y otra región de 0.73 kb que corresponde a la región media, conocida como *vacA m* (6,10,33).

La región señal del gen *vacA* codifica para un péptido señal y para el extremo amino de la toxina VacA procesada; el tipo *s1* es completamente activo, mientras que el tipo *s2* tiene un extremo amino corto que bloquea la formación de vacuolas y disminuye la formación de poros en las membranas eucariotas (6,10,12,17,18,33). Las cepas *vacA s2* son raramente aisladas de pacientes con úlceras

pépticas o adenocarcinoma gástrico (6,10,12,17,33).

La región media de *vacA* codifica para parte del dominio de unión de la toxina a la célula. Basados en la secuencia de nucleótidos de esta región las cepas son clasificadas en dos familias de alelos: alelo tipo *m1* para las cepas de *H. pylori* que tienen actividad citotóxica y el alelo *m2* para las cepas que no tienen actividad citotóxica (3).

Las formas *s1/m2* interactúan y vacuolizan un rango menor de células e inducen un menor daño que las formas *s1/m1*. Sin embargo, también actúan eficientemente en la formación de poros en las membranas e incrementan la permeabilidad celular (6, 10, 12, 14, 33). En general se ha visto que las cepas *vacA s1/m1* están asociadas con patologías severas como el carcinoma gástrico (6, 10, 12, 33). No obstante, los datos a nivel mundial son contradictorios, por lo que se hace de gran utilidad realizar estudios que amplíen los datos no sólo a nivel regional, sino mundial para tratar de desarrollar sistemas de reconocimiento de grupos en alto riesgo dentro de poblaciones con altos índices de infección por *H. pylori* como la colombiana.

El objetivo del presente estudio fue aportar datos sobre la prevalencia de *H. pylori* y sobre el genotipo de *vacA* que se presenta en pacientes con diferentes patologías gástricas en la población estudio.

Materiales y Métodos

Pacientes y recolección de muestras

En el estudio se incluyeron 73 pacientes que asistieron a la unidad de endoscopia de la clínica Manuel Elkin Patarroyo del Instituto de Seguros Sociales (ISS) y a un consultorio privado de gastroenterología en Ibagué, Colombia. A todos los individuos participantes se les había indicado la realización de la endoscopia alta como parte del estudio de un cuadro de dispepsia y consintieron de forma escrita su participación en este proyecto. Se excluyeron pacientes con cáncer que hubiesen recibido radioterapia o quimioterapia durante los seis meses previos a la toma de la muestra, pacientes que sufrieran enfermedades cardiovasculares y respiratorias, y aquellos que hubieran recibido tratamiento con antiácido doce horas antes del procedimiento, con bloqueadores de la bomba de protones y H₂ quince días antes de la endoscopia y/o con antibióticos durante los tres meses previos a la toma de muestra. Las muestras consistieron en un fragmento de la región gástrica en donde se observaba la lesión con el fin de realizar el análisis histopatológico de ésta y de otro fragmento de tejido del antro gástrico el cual fue sometido a los análisis moleculares.

Análisis Histológico

El análisis histológico se realizó mediante la coloración con hematoxilina y eosina. Para la detección de *H. pylori* en el tejido se utilizó la coloración de Giemsa.

Extracción de ADN total

La extracción de ADN a partir de un fragmento de tejido del antro gástrico, se realizó mediante un kit comercial de BIORAD® (AquaPure Genomic DNA Kit) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante para la extracción a partir de tejido.

Detección de *H. pylori*

La detección de *H. pylori* se realizó mediante la amplificación de un fragmento del gen 16S rADN especie-específico, utilizando los iniciadores y el protocolo reportado por Thoreson AC, *et al.* 1995 (Tabla 1). La reacción se realizó en un volumen final de 25 µl, que contenía 50 mM de KCl, 20 mM de Tris HCl, pH (8.4), 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato, 1 pm/µl de cada iniciador (ACT-1 y ACT-2), 1.25 U de Taq polimerasa (Invitrogen TM), y aproximadamente 90 ng/µl de ADN genómico. El perfil térmico consistía en un primer paso de denaturación a 94°C por 4 min, seguido por uno de amplificación de 38 ciclos (94°C por 1 min, 52°C por 1 min y 72°C por 1 min); finalmente una elongación a 72°C por 10 min.

Las muestras que resultaron negativas para el PCR del gen 16S rADN se analizaron para descartar la posible inhibición de la reacción mediante la amplificación de un fragmento del gen de la β-Globina humana (Tabla 1) (32) y de una región del gen IL1B humano (Tabla 1) (28).

Para la amplificación de la región del gen de la β globina la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, que contenía 50 mM de KCl, 20 mM de Tris HCl, pH (8.4), 3.0 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada

desoxinucleótido trifosfato, 1 pm/μl de cada iniciador, 1.25 U Taq polimerasa, y alrededor de 60 ng/μl de ADN genómico. El perfil térmico consistió de una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de una amplificación de 35 ciclos (30 segundos a 94°C, 45 segundos a 57.5°C y 45 segundos a 72°C) y finalmente de un paso de extensión a 72°C por 5 minutos.

Para la amplificación de un fragmento de la región -511 del gen IL1B la reacción se realizó en un volumen final de 25 μl, que contenía 50 mM de KCl, 20 mM de Tris HCl, pH (8.4), 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato, 1 pm/μl de cada iniciador, 1.25 U de Taq polimerasa, y 60 ng/ μl de ADN genómico. El perfil térmico para la región señal consistió de una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de una amplificación de 35 ciclos (1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C) y finalmente una extensión a 72°C por 7 minutos.

Tipificación del gen *vacA* de *H. pylori*

La caracterización del gen *vacA* se realizó mediante PCR. Para visualizar los polimorfismos en la región señal se usaron los iniciadores VA1-F y VA1-R con los cuales se pueden diferenciar entre el tipo *s1* y *s2* por la diferencia en tamaño en el producto (Tabla 1) (3, 37). Para la región media se usaron los iniciadores VAG-F y VAG-R que permiten diferenciar entre el tipo *m1*

y *m2* por diferencias en el tamaño del amplicón (Tabla 1) (3, 37).

La reacción se realizó en un volumen final de 25 μl, que contenía 50 mM de KCl, 20 mM de Tris HCl, pH (8.4), 3.0 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato, 1 pm/μl de la mezcla de iniciadores, 1.25U de Taq polimerasa (Invitrogen TM), y 60 ng/μl de ADN genómico. El perfil térmico consistió de una denaturación inicial a 94°C por 4 minutos, seguida de una amplificación de 35 ciclos (1 minuto a 95°C, 1 minuto a 59°C y 1 minuto a 72°C). En el caso de la región media el perfil térmico usado fue el mismo descrito pero la temperatura de anillaje fue de 52°C. Los productos fueron visualizados mediante UV en geles de agarosa al 2% para la región señal y al 1.5% para la región media.

Análisis Estadístico

Para evidenciar si existía o no asociación entre la presencia de *H. pylori*, el genotipo de *vacA*, la edad y/o el sexo de los pacientes con el desarrollo de diferentes patologías se realizó una regresión multinomial y una regresión ordinal por medio de programa SPSS versión 14.0.

Aspectos Éticos

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de los Andes y de la Universidad del Tolima.

Tabla 1. Iniciadores usados en el presente estudio.

Región a amplificar	Nombre del iniciador	Secuencia del iniciador	Tamaño del producto (pb)
16S rADN	ACT-1	CTTGCTAGAGTGC TGATTA	537
	ACT-2	TCCCACACTCTAGAATAGT	
β - globina	PC O3	CAACTTCATCCAC GTTCACC	110
	PC O4	ACACAAACTGTGTTCACTAGC	
IL1B		TGGCATTGATC TGGTTCATC	304
		GTTTAGGAATC TTC CCACTT	
<i>vacA</i> m1/m2	VAG-F	GGTCAAAATCGGTCATGG	m1: 570
	VAG-R	CCATTGGTACCTGTAGAAAC	m2: 645
<i>vacA</i> s1/s2	VA1-F	ATGGAAATACAACAAACACAC	s1: 259
	VA1-R	CTGCTTGAATGCGCCAAAC	s2: 286

Resultados

De los 73 pacientes incluidos 44 eran mujeres y 29 hombres, se encontraban en un rango de edad entre 19 y 79, con un promedio de 55 años. Del análisis histológico se encontró que 76.7% padecían gastritis no atrófica, 5.5% padecían gastritis atrófica, 8.2% metaplasia, 2.7% carcinoma gástrico y para el 6.8% de los pacientes no se reportó ninguna patología.

En la población estudiada se observó una prevalencia de la infección con *H. pylori* del 58.9% (43/73) por medio de la detección del fragmento especie específico del gen 16S rDNA y de 67.1% (49/73) por el análisis histológico.

En las muestras que dieron negativas al realizar la detección molecular de *H. pylori* se amplificó un fragmento del gen de la β -Globina y de la interleuquina 1 β humano, lo cual descartó una inhibición de la reacción en cadena de la polimerasa.

En cuanto a la caracterización del gen *vacA* se genotipificaron 50 de las 73 muestras analizadas, 29 muestras resultaron ser s1, 22 s2, 27 m1 y 24 m2. De las 50 muestras tipificadas 52% eran *vacA* s1m1,

42% *vacA* s2m2, 4% s1m2 y 2% s1,s2,m1,m2. Ésta última muestra se excluyó de los análisis estadísticos.

El número de muestras en las que se tipificó el gen *vacA* es mayor que el número de muestras que dieron positivas para el gen 16S rADN. No obstante, en algunas de estas muestras que resultaron ser *H. pylori* negativas por la detección molecular del gen 16S rADN, se observaron bacilos con la tinción con Giemsa. Para una de las muestras que resultó ser positiva para la presencia de la bacteria por medio del 16S rADN no se obtuvo amplificación de ninguna de las dos regiones del gen *vacA*.

Al realizar la regresión ordinal para hallar si existía una relación entre el genotipo de *vacA* (s1m1 > s2m1 > s1m1) y/o la presencia de *H. pylori* (presente > ausente) con el desarrollo de diferentes patologías gastroduodenales (cáncer > metaplasia > gastritis atrófica > gastritis no atrófica) no se observó ninguna asociación. Los valores de p siempre fueron mayores a 0.05 (datos no mostrados). Razón por la cual se decidió realizar una regresión multinomial con el fin de evaluar el efecto de cada una de las

variables analizadas de forma independiente en el desarrollo de cada una de las patologías evaluadas también de forma independiente, no obstante, tampoco se halló una asociación (Figuras 1). En los análisis

estadísticos realizados se consideró que la diferencia era significativa cuando el valor p era menor de 0.05 ($p < 0.05$).

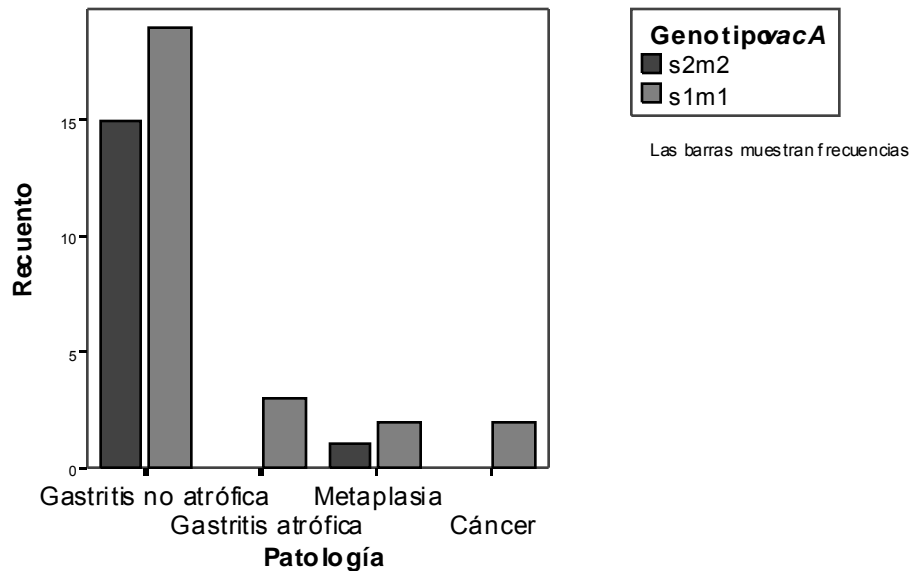


Figura 1. Gráfica de la regresión multinomial para buscar la correlación entre los genotipos de *vacA* y el desarrollo de diferentes patologías gastroduodenales. El genotipo *vacA s2m1* fue eliminado debido al bajo número de pacientes que se incluyeron en esa categoría ($p > 0.05$).

Análisis de Resultados

En 2003 Bravo, *et al.* (8) analizaron reportes histológicos de pacientes de Ibagué, Tolima reportando una prevalencia de *H. pylori* en esta ciudad del 59.5%. En el presente estudio se obtuvo una prevalencia de 67.1%, en pacientes residentes en el Tolima, por medio del análisis histológico y de 58.9% al hacer la detección del gen 16S rDNA, especie específico, esta última es más cercana a la reportada por Bravo, *et al.* (8). La discrepancia encontrada entre los dos métodos puede deberse al azar, para evaluar esta posibilidad se calculó la concordancia de los resultados de las dos pruebas mediante el índice kappa el cual resultó ser de 0.76, lo

que indica una buena concordancia entre los métodos.

H. pylori coloniza la mucosa gástrica humana y puede permanecer allí durante décadas sin que se presente ningún síntoma (6,10,21,22,23). Por otro lado, su presencia puede causar desde una inflamación leve hasta cáncer. Se ha reportado que este microorganismo es el agente etiológico del 70- 80% de los casos de gastritis crónica y puede ser el causante del 40% de los casos de cáncer gástrico a nivel mundial (9, 10). Esta bacteria fue clasificada como carcinógeno de clase I por la Agencia Internacional para Investigación en Cáncer en 1994 (10, 29). No obstante, con los datos obtenidos en este estudio no se

encontró asociación entre la presencia de la bacteria, determinada por la detección del gen 16S ADN o por la presencia del gen *vacA*, con el desarrollo de gastritis no atrófica, atrófica, metaplasia o cáncer.

En cuanto a la tipificación del gen *vacA* se observó una mayor asociación entre los alelos *s1m1* y *s2m2* (3, 5, 10, 11, 29) teniendo en cuenta que la mayoría de muestras presentaban estos genotipos. Se determinó que una de las muestras presentaba los tipos *s1*, *s2*, *m1* y *m2*. Sin embargo, con el método usado en este estudio el cual consistió de la tipificación directa de biopsia no es posible determinar el genotipo específico de las cepas presentes en este paciente. Esta falencia puede ser superada al cultivar y aislar la bacteria. No obstante, es necesario tener en cuenta que este agente es de difícil cultivo y que es potencialmente peligroso (25,30).

Para una de las muestras que resultó ser positiva para la presencia de la bacteria tanto por histología como por el método molecular no se obtuvo amplificación para ninguna de las regiones del gen *vacA*. Una posible explicación, es que la infección en este paciente sea por una cepa que presente un genotipo de *vacA* que no pueda ser amplificado por las parejas de iniciadores usadas en este estudio (27,10). Por ejemplo, un estudio realizado en Alemania con 30 cepas reportó que no logró amplificar una de ellas con los iniciadores específicos para la región media, después de analizar la región media de esta cepa el estudio reportó una diferencia del

9.3% de nucleótidos con las cepas *m2*, denominándola *m3*(10).

En siete muestras se tipificó el gen *vacA* pero no se detectó el microorganismo por medio del gen 16S rADN, estos resultados pueden deberse a diferencias en la sensibilidad de las parejas de los iniciadores usadas para amplificar cada uno de los fragmentos blanco. La diferencia en la sensibilidad de diversas parejas de primers ha sido descrita por varios autores en diferentes organismos (36).

Al realizar el análisis estadístico para hallar una posible asociación entre la presencia de la bacteria, el genotipo de *vacA*, no se encontró una relación significativa (Figura 1). Es posible que los altos valores de *p* (mayores a 0.05) obtenidos se deban a que el número de pacientes en varias de las categorías no sea suficiente teniendo en cuenta el número de variables analizadas.

En otros estudios realizados con cepas colombianas se sugiere que *vacA* no parece ser útil como marcador de virulencia, lo cual concuerda con lo obtenido en el presente estudio. Esto debido a un número alto de individuos, con cepas *vacA s1m1*, que padecen diferentes patologías gastro-duodenales, inclusive pacientes con gastritis (11,37).

El presente estudio aportó datos sobre la prevalencia de *H.pylori* y los genotipos de *vacA* presentes en la población estudio. Por otra parte no se evidenció una asociación entre la presencia de *H. pylori*, ni el genotipo de *vacA* con el desarrollo de patologías gástricas como la gastritis no atrófica y atrófica,

metaplasia o cáncer en pacientes residentes en Tolima, Colombia.

REFERENCIAS

1. Alm Richard AL, Ling Lo-See L, Moir Donald T., King Benjamin L., *et al.* Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1999; 397: 176-180.
2. Amieva MR, Salama NR, Tompkins LS, Falkow S. *Helicobacter pylori* enter and survive within multivesicular vacuoles of epithelial cells. *Cell Microbiol* 2002; 4:677-690
3. Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MKR, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1995; 270:17771-17777
4. Blanchard TG, Nedrud JG, Czinn SJ. Local and systemic antibody responses in humans with *Helicobacter pylori* infection. *Can J Gastroenterol* 1999; 13:591-594
5. Blaser MJ, Parsonnet J. Parasitism by the "slow" bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. *J Clin Invest* 1994; 94:4-8
6. Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J. Clin. Invest.* 2004; 113: 321-333.
7. Boncristiano M, Paccani SR, Barone S, Ulivieri C, Patrussi L, Ilver D, Amedei A, D'Elios MM, Telford JL, *et al.* The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J Exp Med* 2003; 198: 1887-1897
8. Bravo LE, Cortés A, Carrascal E, Carrascal E, Jaramillo R., Garcia LS. *Helicobacter pylori*: patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. *Colombia Med* 2003; 34: 124-131
9. Cassaro M, Rugge M, Gutiérrez O, Leandro G, Graham D Y, Genta M. Topographic patterns of Intestinal metaplasia and gastric cancer. *Am J Gastroenterol* 2001; 95: 1431-8.
10. Castillo-Rojas G., Mazari-Miríart M., López-Vidal Y. *Helicobacter pylori*: Focus on CagA and VacA mayor virulence factors. *Salud pública de México* 2004; 538-548.
11. CITTELLY P, Diana M, HUERTAS, Mónica G, MARTINEZ, Julián D *et al.* Los genotipos de *Helicobacter pylori* en gastritis no atrófica difieren de los encontrados en úlcera péptica, lesiones premalignas y cáncer gástrico en Colombia. *Rev. méd. Chile*, 2002; 130: 143-151.
12. Cover TL, Blaser MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1992; 267: 10570-10575
13. Cover TL, Krishna US, Israel DA, Peek RM Jr. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res* 2003; 63:951-957
14. Czajkowsky DM, Iwamoto H, Cover TL, Shao Z. The vacuolating toxin from *Helicobacter pylori* forms hexameric pores in lipid bilayers at low pH. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:2001-2006
15. de Bernard M, Arico B, Papini E, Rizzuto R, Grandi G, Rappuoli R, Montecucco C. *Helicobacter pylori* toxin VacA induces vacuole formation by acting in the cell cytosol. *Mol Microbiol* 1997; 26:665-674
16. de Bernard M, Burroni D, Papini E, Rappuoli R, Telford J, Montecucco C. Identification of the *Helicobacter pylori* VacA toxin domain active in the cell cytosol. *Infect Immun* 1998; 66:6014-6016
17. Fujikawa A, Shirasaka D, Yamamoto S, Ota H, Yahiro K, Fukada M, Shintani T, Wada A, Aoyama N, *et al.* Mce deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type Z are resistant to gastric ulcer induction by VacA of *Helicobacter pylori*. *Nat Genet* 2003; 33:375-381
18. Galmiche A, Rasmussen J, Doye A, Cagnol S, Chambard JC, Contamin S, de T, V, Just I, Ricci V, *et al.* The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J* 2000; 19:6361-6370
19. Gebert B, Fischer W, Weiss E, Hoffmann R, Haas R. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* 2003; 301:1099-1102
20. Gebert B, Fischer W, Haas R. The *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: from cellular vacuolation to immunosuppressive activities. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2004; 152: 205-220.
21. Hardin F.J., Richard A. W.,

- Helicobacter pylori*: Review and Update. Hospital Physician 2002; 23 - 31.
22. Lee A., Fox J., Hazell S. Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: a Perspective Infect and Immunity 1993; 1601-1610
 23. Letley DP, Rhead JL, Twells RJ, Dove B, Atherton JC. Determinants of non-toxicity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. J Biol Chem 2003; 278:26734-26741
 24. Li Y, Wandinger-Ness A, Goldenring JR, Cover TL. Clustering and redistribution of late endocytic compartments in response to *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. Mol Biol Cell 2004; 15: 1946-1959
 25. Logan RPH, Waker MM Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. BMJ 2001; 232: 920-922
 26. McNulty CAM, Wyatt JI. *Helicobacter pylori*. J Clin Pathol 1999; 52: 338-344
 27. Morales-Espinosa R, Castillo G, Gonzalez-Valencia G, Ponce de Leon S, Cravioto A, Atherton JC, Lopez Y. Colonization of Mexican Patients by Multiple *Helicobacter pylori* Strains with Different *vacA* and *cagA* Genotypes. J Clin Microbiol. 1999; 37: 3001-3004.
 28. Muillo LS.; Land J.A.; Pleijster J.; Bruggeman C.A.; Peña A.S.; Morré S.A.: Interleukin-1B (IL-1B) gene polymorphisms are not associated with tubal pathology and *Chlamydia trachomatis*-related tubal factor subfertility. Human Reprod 2003; 18:2309-2314
 29. Quiroga AJ, Cittelly DM, Bravo MM. Frecuencia de los genótipos *babA2*, *oipA* y *cagE* de *Helicobacter pylori* en pacientes con enfermedades gastroduodenales. Biomédica 2005; 25: 325-34.
 30. Rivas-Traverso F., Hernandez F., *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. Rev Biomed 2000; 11: 187-205
 31. Rittig MG, Shaw B, Letley DP, Thomas RJ, Argent RH, Atherton JC. *Helicobacter pylori*-induced homotypic phagosome fusion in human monocytes is independent of the bacterial *vacA* and *cag* status. Cell Microbiol 2003; 5:887-899
 32. Saiki RK, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985; 230:1350-1354.
 33. Suerbaum S, McHetti P. *Helicobacter pylori* Infection. N. Engl. J. Med. 2002; 347: 1175-1186.
 34. Telford JL, Covacci A, Rappuoli R, Chiara P. Immunobiology of *Helicobacter pylori* infection. Curr Opin Immunol 1997; 9:498-503
 35. Thoreson A.C.E, Borre M.B., Andersen L.P. Elsborg S., Holck S. Conway P., et al. Development of a PCR-based technique for detection of *Helicobacter pylori*. Immunol Med Microbiol 1995; 10: 325-334
 36. Wilson I.G. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. Appl. Environ. Microbiol. 1997, 63:3741-3751.
 37. Yamaoka Y, Kodama T, Kita M, Imarishi J, Kashima K, Graham DY. Relationship of *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* to *cagA* status, cytotoxin production, and clinical outcome. *Helicobacter* 1998; 3: 241-53.